

طريقة مبسطة لتنقية لكتين الحنطة بكروماتوكرافيا الألفة

إيناس مظفر العبادي¹ محمد عمر محي الدين² علي عبد الرحمن طه³
 1، 2 قسم علوم الأغذية والتغذية الاحيائية - كلية الزراعة - جامعة بغداد - بغداد - العراق
 3 مركز بحوث التقنيات الاحيائية - جامعة النهرين - الجادرية - بغداد - العراق

المستخلص

نظرا للاستخدامات المتعددة للكتين النقي فقد هدفت هذه الدراسة إلى استخلاصه من جنين الحنطة ، وهو أحد النواتج العرضية لتصنيع الملحجين . وشملت خطوات الاستخلاص إزالة الدهن من جنين الحنطة باستخدام الهكسان ثلاثه استخلاص اللكتين بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بنسبة (10:1) (وزن/حجم) مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 25 م. و اخضع المستخلص الخام لخطوات تنقية عدة تمثلت بتركيزه بالترشيح الفائق لإزالة نسبة كبيرة من المركبات ذات الأوزان الجزيئية التي تقل عن 10000 دالتون. وأجريت عملية غسل وترشيح متكررة Diafiltration للنموذج المركز باستخدام محلول Tris-HCl للداري بتركيز 0.01 مولار ذي الأس البيدرجيني 8.5 وحقت هذه الخطوة تنقية جزئية للكتين بلغت 5.71 مرة وبخصيلة مقدارها 98.34 % . تلتها خطوة كروماتوكرافيا التبادل الأيوني بأسلوب الوجبة باستخدام المبادل ثنائي ثيل امينو اثيل سيليلوز DEAE-Cellulose وبلغت عدد مرات التنقية لجزء الغسل 7.5 مرة في حين بلغت خصيلة للكتين 80 % . وأخيرا جرت خطوة تنقية اللكتين باستخدام كروماتوكرافيا الألفة بسمود الكايتين والذي حضر مخفريا من الهيكل الخارجي للروبيان وأسفرت عملية التحضير عن الحصول على ما يقارب من 40 غم كاييتين أي ما يعادل 20 % كاييتين من وزن القشور الجافة واستخدم الكايتين المحضر بوصفه شبكة للفصل و ذراعا في كروماتوكرافيا الألفة لتنقية اللكتين. وبلغت عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوة 20 مرة وبخصيلة مقدارها 19.51 % . وقد تبين ان اللكتين المنقى يتميز بנקوة عالية حد التجانس وذلك بظهوره حزمة واحدة عند ترحيله كهربائيا في هلام متعدد الاكريلاميد بظروف ملسفة بوجود المادة المختزلة 2-ميركابتوإيثانول وغايبها. وبتابع الخطوات المذكورة في هذه الدراسة بلغت كمية اللكتين المحصل عليها 60 ملغم/ 1000 غم من جنين الحنطة .

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (2): 44-53 (2008) Aubadi et al.

SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF WHEAT GERM LECTIN BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Inas M. Al-Aubadi¹ Mohamed O. Muhyaddin² Ali A.Taha³

1, 2 Depart. of Food Sci. & Biotechnology, College of Agriculture, Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.

3 Biotechnology Research Center, Al-Nahrain Univ.

ABSTRACT

Because of various application of purified lectin, the aim of this study was to extract it from wheat germ which is one of the byproducts from wheat processing . The extraction steps including fat elimination from wheat germ by heptan followed by lectin extraction by 0.05 M hydrochloric acid solution in ratio (1:10)(w/v) for one hour at 25C . The crud extract was subjected to different purification steps including concentration by ultrafiltration by this step it was possible to eliminate high portion of low molecular wight compounds which is below 10000 dalton. The difiltration was done to concentrated the sample by 0.01 M Tris-HCL, pH 8.5 .The purification folds and yeild of the lectin were 5.71 and 98.34% respectively. Ion-exchange chromatography by bachwise procedure using Diethel amino ethel cellulose (DEAE-Cellulose) then affinity chromatography by chitin column, where the chitin itself was prepared from outer shells of shrimp ,we obtained about 40 g chitin which is equal to 20% chitin from the dry shells then the chitin was used as a matrix and a ligand in affinity chromatography for purification of the lectin after this step the purification fold was 20 and yeild of the lectin was 19.51 % . The lectin was purified to homogeneity as indicated by presence of one band in polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions in presence and absence of the reducing

agent 2- mercaptoethanol. The amount of lectin is about 60 mg/1000 gm of wheat germ when using the steps which indicated in this study.

• بحث مستقل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

اكتشفت للكتينات لأول مرة عام 1889 من لدن الباحث Stillmark في جامعة Dorput في استونيا عندما لاحظ ان مستخلصات بذور الخروع *Castor bean* (*Ricinus communis*) تمتلك قدرة على ملائمة كريات الدم الحمر ثم قام بعزل المادة المسؤولة عن التلازن ونقاها جزئياً وسماها بالريسين Ricin، مسجلاً بذلك أول دراسة حول الملازونات النباتية. وبعد مدة وجيزة اكتشف Helfin من الجامعة نفسها ان المستخلص السم لـ بذور نبات Jequirity bean (*Abrus precatorius*) يمتلك قدرة مماثلة على ملائمة الخلايا وسمي الملازن الجديد بـ Abrin (6، 26). وتعد للكتينات النباتية مجموعة غير متجانسة من البروتينات أو البروتينات السكرية التي تشترك بقدرة على الارتباط بوحدة سكرية محددة فضلاً عن ملائمة الخلايا. ونظراً لوجود اللكتينات في أنواع عديدة من النباتات وضمن نسج مختلفة لذلك يعتقد انها تؤدي أدوار بايولوجية مهمة (19) وقد عرفت للكتينات بانها بروتينات أو بروتينات سكرية ذات طبيعة تختلف عن الأجسام المضادة والانزيمات كونها ترتبط ارتباطاً متخصماً وعكسياً بالكاربوهيدرات مما يسبب تلازن الخلايا أو ترسيب السكريات المتعددة والمقترنات السكرية Glycoconjugates (27). تزايد عدد اللكتينات المكتشفة بشكل ملحوظ إذ اكتشفت المئات منها من مصادر مختلفة وفي مقدمتها بذور النباتات (3، 11) فضلاً عن الحيوانات (4، 5، 14) والأحياء المجهرية (2، 23، 28). استحوذت اللكتينات على اهتمام الباحثين، عندما ذكر Aub وزملاؤه المواد وطرائق العمل

عام 1963 لأول مرة وجود مادة نسي المستخلص التجاري لـ لايبيلز جلين الحنطة لها القدرة على ملائمة الخلايا الخبيثة Malignant cells خلافاً للخلايا الطبيعية وبعد مرور بضع سنوات سميت المادة المسببة للفعالية التلازنية لجنين الحنطة بملازن جنين الحنطة (WGA) Wheat germ agglutinin ويتميز هذا للكتين بقدرته على الارتباط وبشكل متخصص بـ N-acetylglucosamine و N-acetylnuraminic acid (25) وازداد الاهتمام بهذا للكتين مع اكتشاف ان هذا البروتين يؤدي أدواراً مهمة في نبات الحنطة، وبسبب الأهمية المتزايدة للكتين في التطبيقات التشخيصية ولارتفاع ثمن المستورد منه، إذ يعد WGA أحد اللكتينات الباهضة الثمن، ونظراً لافتقار البلد إلى مثل هذا النوع من الدراسات والحاجة الماسة إلى مثل هذه التطبيقات وخصوصاً فيما يتعلق بالإفادة من نواتج تصنيع الحنطة بوصفها مادة خبث يمكن الإفادة منها في هذا المجال الحيوي، فقد وقع الاختيار على مخلفات المطاحن من جنين الحنطة الذي يمزج في بعض مطاحن القطن بشكل أكثر نقاوة عن النخالة، بهدف تنقية اللكتين منه لاعتماده أداة مهمة في حقول البحوث الحيوية عن طريق استخدامه وسيلة تشخيصية في الكيمياء الحيوية وفي مجالات المناعة وعلم الأحياء المجهرية والمجالات الأخرى ذات الصلة.

الجيلين جافة ونظيفة ومحكمة الإغلاق بدرجة حرارة - 18 م لحين الاستخدام.

2- تحضير للمستخلص الخام للكتين جنين الحنطة: حضر المستخلص الحامضي الخام وفقاً للطريقة التي ذكرها Ruckenstein و Zeng (29) إذ جرى إزالة الدهن من 500 غم من جنين الحنطة المطحون مرتين بمزجه مع

1- تهيئة مسحوق جنين الحنطة: تم الحصول على جنين الحنطة من الشركة العامة لتصنيع الحبوب / مطحنة النورة و استخدم بوصفه مصدراً للكتين. جرى طحن الجنين وغربله في طاحونة كهربائية مختبرية للحصول على مسحوق ناعم وحفظ في أكياس بولي

3000 مل من البيتان لمدة ساعتين بدرجة حرارة 25 م ، ترك ليترك مدة 15 دقيقة ثم رشح عبر قماش من القطن ناعم الترشيح تحت التفريغ عبر ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 وجفف هوائيا لليوم التالي للتخلص من بقايا البيتان. وتم استخلاص للكتين بتعلق جنين الحنطة مزال الدهن بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بنسبة (10:1) (وزن/حجم) ومزج بمحرك مغناطيسي مدة ساعة واحدة بدرجة حرارة 25 م ثم ترك ليترك لمدة 15 دقيقة قبل ترشيحه عبر قماش من القطن ونبد الراشح مركزيا بسرعة $g \times 10000$ مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 م.

3- تقدير فعالية للكتين : قدرت فعالية للكتين بطريقة التسايزن الدموي Hemagglutination assay وفق طريقة Ruckenstein و Zeng (29) بإجراء التخفيف المتسلسل Serial dilution لـ 50 مايكرو لتر من النموذج مع حجم معيار من محلول الملح التسلسلي

5- تنقية للكتين :

أ- تركيز للكتين : أجريت عملية الترشيح الفائق للمستخلص الخام في خلية الترشيح الفائق باستخدام المرشح الغشائي peillicon® membran millipore (PT Series) الذي يمنع مرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية التي تزيد عن 10000 دالتون في خلية الترشيح تحت ضغط غاز النتروجين مقداره 50 بلوند/إنج² بدرجة حرارة 4 م . وجرى عملية الغسل والترشيح المتكرر Diafiltration للنموذج المركز باستخدام محلول HCl - Tris للداري بتركيز 0.01 مولار ذي الأس الهيدروجيني 8.5. قيس بعدها حجم المركز و قدرت فعاليته التلازمية وتركيز البروتين فيه.

ب- للتنقية بعمود كروماتوغرافيا التبادل الأيوني : ضبط الأس الهيدروجيني للمحلول المركز من خطوة الترشيح الفائق إلى أس هيدروجيني 8.5 بإضافة بلورات التريس Tris ومزج مع 400 مل من المبادل الأيوني الرطب DEAE- Cellulose الموازن بمحلول Tris-HCl الداري بتركيز 0.01 مولار بأس هيدروجيني 8.5 في بيكر وبعد مرور ساعة رشح تحت تفريغ على ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 في قمع بخنر وغسل

المبادل بمحلول Tris-HCl الداري وجمعت الأجزاء الحاوية على فعالية تلازمية ، بعدها قيس الحجم و قدرت للفعالية التلازمية وتركيز البروتين بالأسلوب السابق ذكره.

ج - تحضير الكايتين مختبريا: اتبعت طريقة الجلاح (1) في تحضير الكايتين من الروبيان Shrimp الذي تم الحصول عليه من محافظة البصرة واستخدمت مخلفاته غير الصالحة للأكل (الهيكسل الخارجي) مصدرا طبيعيا للحصول على الكايتين.

د- كروماتوغرافيا الألفة Affinity chromatography
اخضع الكايتين المحضر مختبريا لمعاملات أولية قبل استخدامه في عمود الألفة إذ طحن في طاحونة كهربائية ليضع دقائق وغسل تحت التفريغ في قمع بخنر لمرات عدة بالماء المقطر ومن ثم غسل بحامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 عياري تلاءه الغسل بكاربونات الصوديوم بتركيز 1% ولخيرا غسل بالكحول الايثيلي بتركيز 98% بحيث بلغت قيمة الامتصاصية لمحلول الغسل أقل من 0.05 عند طول موجي 280 نانومتر، ثم عيى في عمود بأبعاد (48×2.5 سم) وجرى موازنة عمود الألفة

قيمت الامتصاصية للأجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانومتر وجمعت الأجزاء الحاوية على الفعالية التلازمية.

6- الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلاميد بوجود المواد المسففة استخدمت هذه الطريقة لاختبار نقارة اللكتين المنقى وحضرت المحاليل وأجريت عملية الترحيل الكهربائي تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل (11) Garfin.

ملئ مولار لمحول الاستخلاص الحامضي لمنع تفاعلات أكسدة الصبغات التي تسبب في تغير لون المستخلص إلى بني غامق وللحصول على مستخلص يحتوي على مواد ملونة محدودة (7). ويوضح الجدول 1 ان الفعالية النوعية للكتين المستخلص من ثلاث وجبات مختلفة تتراوح بين 48.19 - 63.49 وحدة/ملغم وبمعدل مقداره 56 وحدة/ملغم. ولما كان مقدار جنين الحنطة المستخدم في كل وجبة هو 500 غم من الجنين مزال الدهن عليه فإن غراماً واحداً من جنين الحنطة يوفر كمية من اللكتين مقدارها 326.82 وحدة/غم من جنين الحنطة ويعزى التباين في كمية اللكتين المستخلص من وجبة لأخرى إلى تأثير عوامل مختلفة لعل أهمها خطوة إزالة الدهن من الجنين لغرض تهيئته للاستخلاص.

بمحلول HCl - Tris لنداري بتركيز 0.01 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5 ثم مرر محلول اللكتين من خطوة التبادل الأيوني في عمود الكايتين بسرعة جريان 2 مل / دقيقة، غسل بمحلول HCl - Tris لنداري تبعه إجراء الفصل بمحلول HCl - Tris لنداري الحاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5 ومن ثم غسل العمود بمحلول HCl - Tris لنداري، وجرى إزاحة اللكتين باستخدام محلول حامض HCl بتركيز 0.05 مولار، وتمت عملية الفصل والاسترداد بسرعة جريان 300 مل/ساعة بواقع 10 مل/جزء،

النتائج والمناقشة

1- تحضير المستخلص الخام للكتين جنين الحنطة بسبب ارتفاع محتوى جنين الحنطة من الدهون التي بلغت 9.77% للعينات قيد الدراسة وبغية الحصول على WGA بنقاوة عالية تحتم إزالة الدهن أولاً باستخلاصه بالهبتان. إذ ان استخدام جنين الحنطة غير مزال الدهن يؤدي إلى قلة كفاءة استخلاص البروتين ويؤدي وجود الدهن إلى بطء سرعة الجريان في أعمدة الفصل (7). وبسبب ثباتية WGA عند أسس هيدروجينية منخفضة فقد تم استخلاص اللكتين من جنين الحنطة مزال الدهن باستخدام محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار بدلاً من الماء المقطر أو المحاليل للادارة. وبيئت التجارب الأولية في هذه الدراسة ان المستخلص الخام يغلب عليه اللون البني، وعليه أضيف Sodium dithionite بتركيز

جدول 1 . كمية وفعالية لكتين جنين الحنطة الخام المستخلص في ثلاث وجبات مختلفة

الوجبة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	كمية اللكتين (وحدة/غم جنين)
1	4125.00	40	0.83	48.19	3423.75	164990.51	329.98
2	4087.00	40	0.71	56.33	2901.77	163456.70	326.91
3	4045.00	40	0.63	63.49	2548.35	161794.74	323.58
المعدل	4085.66	40	0.72	56.00	2941.67	163413.98	326.82

الهيدروجيني 2.2 أدى إلى تحرر اللكتين المرتبط بالتركيب الخلوي ومن ثم زيادة ذائبته.

لقد أشار Grant وآخرون (12) عند استخلاص اللكتينات من مجموعة من النباتات الاسطوانية إلى احتوائها على كمية ضئيلة من اللكتينات، ان لم تكن معدومة وذلك عند إجراء الاستخلاص في أس هيدروجيني قاعدي، إلا ان إجراء الاستخلاص عند الأس

2- تلبية لكتين جنين الحنطة

أ- تركيز الكتين

أخضع المستخلص الحامضي (الخام) لمسللة من خطوات التنقية تمثلت الخطوة الأولى منها بتركيز مستخلص الكتين الخام بوساطة تقنية الترشيح للفائق Ultrafiltration للتخلص من نسبة كبيرة من الماء. وأمكن بهذه الخطوة إزالة نسبة كبيرة من المركبات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة التي تقل عن 10000 دالتون مع الانتعاش الخارج من خلية الترشيح للفائق. وأجريت عملية Diafiltration للتموذج المركز باستخدام محلول Tris-HCl الدائري بتركيز 0.01 مولار ذي الأس الهيدروجيني 8.5. وحقت هذه الخطوة تنقية جزئية للكتين بلغت 5.71 مرة وبخصيلة مقدارها 98.34 % كما موضح في (الجدول 2).

ب- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

يوضح الجدول 2 أن عدد مرات التلقية وخصيلة الكتين للمحلول الناتج من خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لجزء الغسل بلغت 7.5 مرة بخصيلة 80 %.

إن القصار للفعالية التلازمية على أجزاء الغسل فقط يؤكد عدم ارتباط الكتين بالمبادل الأيوني السالب وإن محصلة الشحنات المحمولة على الكتين في الظروف المستخدمة هي شحنات موجبة أو قريبة من نقطة التعادل الكهربائي. وتتجلى أهمية هذه الخطوة في التخلص من الصبغات معظمها ونسبة كبيرة من البروتين عن طريق احتجازها بالمبادل ففي الأس الهيدروجيني 8.5 تنمض المركبات الملونة على مادة الفصل ولم تلاحظ فعالية تلازمية للبروتينات المرتبطة بالمبادل الأيوني بعد استردادها.

جدول 2 . خطوات تنقية لكتين جنين الحنطة

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	المعيار	البروتين (مغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/مغم)	الفعالية الكلية (وحدة x 10 ³)	البروتين الكلي (مغم)	عدد مرات التلقية	الخصيلة (%)
المستخلص الحامضي	4100	40	1:2	0.75	53.33	164	3075	1	100
الترشيح للفائق	252	640	1:32	2.10	304.76	161.28	529.2	5.71	98.34
التبادل الأيوني (الوجبة)	410	320	1:16	0.80	400.00	131.20	328	7.5	80
كروماتوغرافيا الألفة	50	640	1:32	0.60	1066.60	32	30	20	19.51

ج- تحضير الكايتين مختبريا

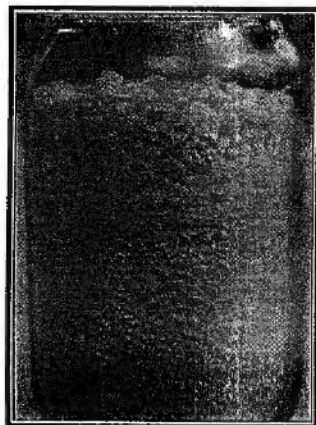
نظرا لتعذر الحصول على كمية كبيرة من الكايتين المحضر تجاريا فضلا عن غلاء ثمنه فقد جرى تحضيره مختبريا في هذه الدراسة ، إذ تم الحصول على الروبيان Shrimp من محافظة البصرة واستخدمت مخلفاته غير الصالحة للأكل (الهيكال الخارجي) مصدرا طبيعيا للحصول على الكايتين، وتمخضت عملية التحضير عن الحصول على ما يقارب من 40 غم كايتين أي ما يعادل 20 % كايتين من وزن القشور الجافة. ويبين الشكل 1 قنور الكايتين المحضر مختبريا في هذه الدراسة. تخذت خاصية الارتباط المتخصص للكتين جنين الحنطة بالسكر الأميني أساسا في خطوة تنقية تلك الكتين

باستخدام كروماتوغرافيا الألفة. إذ استخدم الكايتين وهو متعدد حيوي Biopolemer ويوصف كيميائيا بأنه Poly - β - (1.4)-Nacetyl-D-Glucosamine ويعد ثاني أكبر معتد كيميائي يصنع بشكل طبيعي على وجه البسيطة بعد السليلوز فهو مكون أساس لهيكل عدد كبير من اللاقاريات كالقشريات والحشرات والديدان الشجانية وبعض المجاميع الفطرية (18، 24). لقد استخدمت حبيبات الكايتين chitin beads في العديد من الدراسات لتنقية الكتين من المستخلص الملحي لقرينات (الفلاف الخارجي) لنبات *Caesalpinia tinctoria* الذي ينتمي للعائلة البقولية (10) وكتين *Araucaria angustifolia* المتخصص بـ N-

بعمود الكايتين.

acetylglucosamine المعزول من بذور العائلة

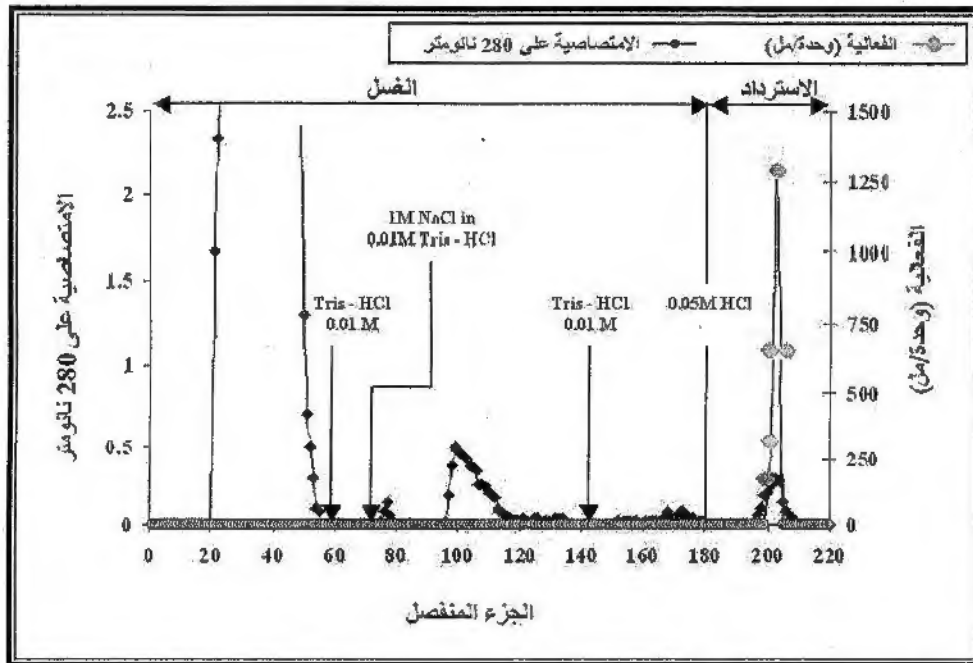
Araucariaceae (22) وبطريقة كروماتوغرافيا الألفة



شكل 1. قشور الكايتين المحضر مختبريا من مخلفات للروبيان

مقارنة مع طرائق التنقية الأخرى كما استبعدت طريقة المسخ الحراري للبروتينات الأخرى الملوثة المرافقة للكايتين (17). وعند احتساب كمية الكايتين المستحصلة من كغم واحد من جنين الحنطة بعد الخطوة الأخيرة من التنقية واتباع الخطوات المذكورة في هذه الدراسة وجد أنها تعادل 60 ملغم/1000غم من الجنين. نظرا لكون WGA هو أحد الكايتينات باهضة الثمن فقد تلاشى الباحثون في إيجاد الفضل للوسائل والنسب لاستخلاصه وتنقيته سواء بطرائق التنقية التقليدية المتمثلة بكروماتوغرافيا السيلادل الأيوني أو بوساطة كروماتوغرافيا الألفة باستخدام أعمدة الألفة المصنعة ovomuroid-sepharose (16) أو باستخدام العمود 1-aminobenzyl-thio-β-D-Glucopyranoside-Sepharose 4B (20) وينكر أن تصنيع أعمدة الألفة تلك، بعد عملية مكلفة ومعقدة في آن واحد. وحدثا ابتكرت أغشية الألفة بوصفها طريقة بديلة عن أعمدة الألفة وتتميز تلك الأغشية بقدرتها العالية على الارتباط بـ WGA إذ تتفوق على حبيبات الكايتين بما يقارب 20 مرة (21).

د- التنقية بكروماتوغرافيا الألفة بعمود الكايتين
بلاحظ من الشكل 2 ظهور قمة واحدة للفعالية التلازمية وذلك بعد استرداد الكايتين بمحلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.05 مولار، وعد ذلك أحد مؤشرات نقاء الكايتين وبلغ عدد مرات التنقية لث هذه الخطوة 20 مرة بحصيلة مقدارها 19.51% (الجدول 2). إن اعتماد الكايتين مادة لفصل للكايتين بطريقة كروماتوغرافيا الألفة له جوانب إيجابية أخرى منها عدم الحاجة إلى تهوية ذراع ligand للتوسط لربط الكايتين بالكايتين مع إمكانية إعادة استخدام الكايتين مرة ثانية بعد إعادة تنشيطه بخطوات بسيطة فضلا عن أنها طريقة اقتصادية إلى حد بعيد لتوافر مصادر الاستخلاص الأساسية المتمثلة بالحيوانات البحرية كالروبيان وسرطان البحر Crab وجراد البحر Lobster في العراق وخصوصا في محافظة البصرة، ونظرا لكونها طريقة سريعة فإنه يمكن اعتمادها لتنقية WGA على مستويات يتضح مما تقدم أن استخلاص WGA وتنقيته بالخطوات المتبعة في هذه الدراسة تمتاز ببساطتها وسرعة إنجازها إذ أنها تتطلب خطوة نبذ مركزي واحدة

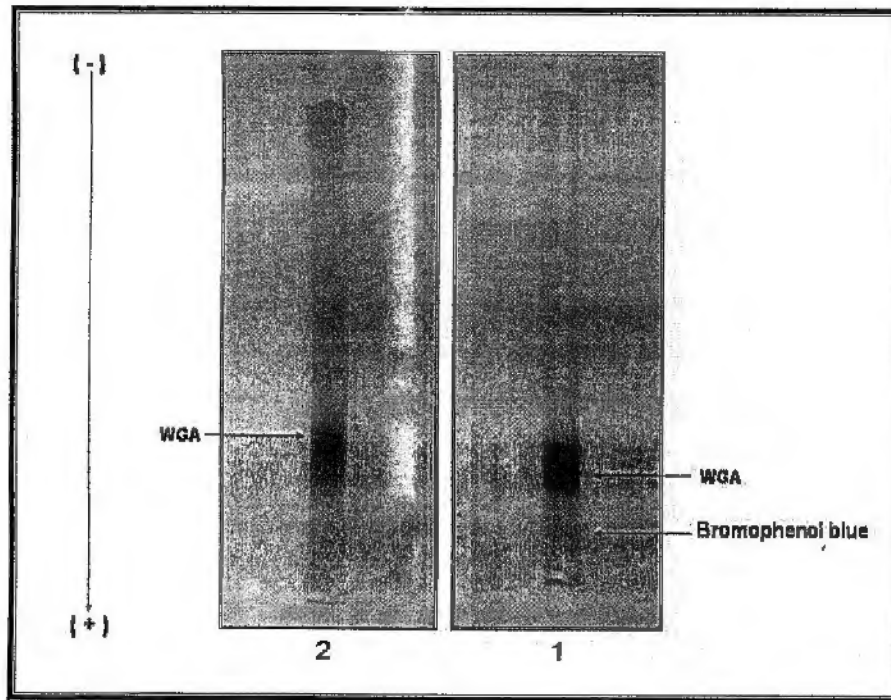


شكل 2. كروماتوغرافيا الألفة لتتقية لكتين جنين الحنطة يصود للكتينين بكماد (2.5×48 سم) الموازن بمحلول Tris-HCl لاداري بتركيز 0.01 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5، مثل الممود بمحلول الموازنة ذاته ثلثه محلول Tris-HCl لاداري بتركيز 0.01 مولار الحلوي على 1 مولار NaCl ذي أس هيدروجيني 8.5 ومن ثم محلول Tris-HCl لاداري بتركيز 0.01 مولار ذي أس هيدروجيني 8.5، جرى الاسترداد بمحلول HCl بتركيز 0.05 مولار وتحت صمليات الفصل والاسترداد بسرعة جريان 300 مل / ساعة بوقع 10 مل للجزء.

2- تعيين نقارة اللكتين

يوضح الشكل 3 نمط الترحيل الكهربائي لـ WGA المنقى بعد خطوة كروماتوغرافيا الألفة وذلك في هلام الاكريلاميد المتعدد بتركيز 12% لعلام الفصل بوجود المواد الماصخة SDS-PAGE. إذ يلاحظ ظهور بروتينين للكتينين على شكل حزمة واحدة مما يعطي صورة واضحة عن مدى كفاءة خطوات تنقية اللكتين التي استنفدت المستخلص من البروتينات والأنزيمات والصبغات المرافقة له كافة في المستخلص الخام كما يدل على نقارة اللكتين. ويلاحظ من الشكل تركيز حزمة البروتين في الجزء السفلي من الهلام مما يشير إلى أن اللكتين ذو وزن جزيئي منخفض نوعاً ما كما يلاحظ من الشكل أن المسافة التي قطعها اللكتينين

بوجود المادة المختزلة 2-Mercaptoethanol أكبر مقارنة مع المسافة التي قطعها اللكتينين بغياب المادة المختزلة مما يوحي بوجوده بكثر من وحدة ثنائية واحدة تربطها أوأصر ثنائية الكبريتيد S-S bond. تعد تنقية اللكتينيات ضرورة ملحة بهدف تعيين صفاتها الجزيئية وإنجاز التطبيقات المختلفة وقد قام الباحثون بتقنية اللكتينيات لغاية التجانس من مصادر نباتية مختلفة (9) (15) وقد ثبت أيضاً أنها كانت نقية بظهورها حزمة واحدة عند ترجيلها كهربائياً في هلام متعدد الاكريلاميد بظروف ماسخة وبوجود مادة مختزلة.



شكل 3. للترجيل الكهربائي للكتين جتين الحنطة المنقى على هلام الاكريلاميد المتعدد SDS-PAGE، إذ يمثل:

1. بوجود 2-Mercaptoethanol 2. بغياب 2-Mercaptoethanol

المصادر

من حالات مرضية أطروحة دكتوراه ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية. ع ص 75 .

3. علي، نورية عبد الحسين والدوري، مهندس حميد والباقر، علاء يحيى. 2001 . غرلة بذور بعض النباتات المحلية لتحديد محتوى للكتينك فيها. مجلة أبحاث التقانة الحيوية 3 (1) : 66-76.

decapoda) hemolymph. Biochimica et Biophysica Acta. 1724(1-2): 86-93.

6. Bies, C.; C. Lehr and J. F. Woodley. 2004. Lectin-mediated drug targeting : history and applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 56: 425-435.

7. Bouchard, P.; Y. Moroux ; R. Tixier; J. Privat and M. Monsigny. 1976. An

1. الجلاخ، علاء هاني حسن . 2000 . عزل وتشخيص الأحياء المجهرية المحلية للكتين في التربة ودراسة قابليتها على تحليل جدران بعض الفطريات. رسالة ماجستير، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بابل. ع ص 40 .

2. العاني ، زينب نوري . 2006 . استخلاص وتنقية جزئية للكتينات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمعزولة

4. Agah, A.; M. C. Montalto ; K. Young and G. L. Stahl. 2001. Isolation, cloning, functional characterization of porcine mannose-binding lectin. Immunology. 102: 338-343.

5. Alpuche, J.; A. Pereyra ; C. Agundis ; C. Rosas ; C. Pascual ; M. Slomiany ; L. Vazquez and E. Zenteno. 2005, Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea

- inner shoots of the edible chive (*Allium tuberosum*). Journal of Protein Chemistry. 20(5): 361-366.
16. LeVine, D.; M. J. Kaplan and P. J. Greenaway. 1972 . The purification and characterization of wheat- germ agglutinin. Biochem. J. 129: 847-856.
 17. Nagata, Y. and M. M. Burger, 1972. Wheat germ agglutinin isolation and characterization. 247(7): 2248-2250.
 18. No, H. K.; S. P. Meyers ; W. Prinyawiwatkul and Z. Xu. 2007. Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. J. Food Sci. 72(5):87-100.
 19. Peumans, W. J. and E. J. M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. 109: 347-352.
 20. Rafestin, M. E.; A. Obrenovitch; A. Oblin and M. Monsigny. 1974. Purification of N-acetyl-D-glucosamine-binding protein by affinity chromatography. FEBS Lett. 40: 62.
 21. Ruckenstein, E. and X. Zeng .2001. Purification of wheat germ agglutinin using macroporous or microporous filtration membrane. United state patent . January 16, 174, 443.
 22. Santi-Gadelha, T.; C. A. A. Gadelha ; K. S. Agarao ; C. C. de Oliverira; M. R. L. Mota ; R. C. Gomes ; A. F. P. Pires ; M. H. Toyama ; D. Toyama ; N. M. N. de Alencar ; D. N. Criddle ; A. M. S. Assreug and B. S. Cavada. 2006. Purification and biological effect of *Araucaria angustifolia* (Araucaceae) seed lectin. Biochem. Biophys Research Commun. 3(50): 1050-1055.
 23. Sato, Y.; M. Murakami; K. Miyazama. 2000. Purification and characterization of anoval lectins. Comp. Biochem. Physiol-B. Biochem. Mol. Biol., 125(2): 169-177.
 - improved method for purification of wheat germ agglutinin (lectin) by affinity chromatography. Biochimie. 58: 1247-1253.
 8. Bradford, M. M. 1976 . A rapid and sensitive methodes for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
 9. Du Silva, A. L. C.; C. G. Hortu and R. D. A. Morerira. 2001 . Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. steua: 13 (3): 262-269.
 10. De Oliveira, M. L.; L. M. Beltramini ; S. G. desimone ; M. H. N. Brumano ; R. A. Silva-Lucca ; M. K. K. Nakaema ; C.V. Pires and M. G. A. Oliveira. 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex De fruits. Braz. J. Plant Physiol. 15(2): 119-122.
 11. Garfin, D. E. 1990. Purification procedures: Electrophoretic Method. In E. D. Murray and P. Dentscher (ed.) . Method in Enzymology. John Wiley and Sons, Inc., N.Y., USA, Vol. 182 . pp. 425-441.
 12. Grant, G.; L. J. More; N. H. Mc Kenzie ; P. M. Dorward, J. C. Stewart ; L. Telek, and A. Pusztai. 1991. A Survey of the nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. Livestock Research for Rural Development. 3 (3):55
 13. Hossain, M. A.; S. M. Rafiqul Islam and Absar. 2004. Purification and characterization of lectin from mulberry seed (*Morus alba* L.). Pakistan J. Biol. Sci. 7 (10): 1808-1813.
 14. Kakiuchi, M.; N. Okino ; N. SueyoshiIchinose, S. ; A. Omori ; S. Kawabata ; K. Yamaguchi and M. Ito. 2002. Purification ,characterization, and cDNA cloning of - N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. Glycobiol. 12(2): 85-94.
 15. Lam, Y. W. and T. B. Ng. 2001 . A monomeric mannose - Binding lectin from

- Phlebodium aureum* (L.) J. Smith (Polypodiaceae). The J. Biol. Chem. 278(13): 10891-10899.
28. Tronchin, G.; K. Esnault ; M. Sanchez ; G. Larcher ; A. Marot-Leblond and J. Bouchara .2002. Purification and partial characterization of a 32-Kilodalton sialic acid -specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. Infection and Immunity. 70(12): 6891-6859.
29. Zeng, X. and E. Ruckenstein. 1999 . Macroporous chitin affinity membrane for wheat germ agglutinin purification from wheat germ.. J. Membrane Sci. 156: 97-107.
24. Shahidi, F.; J. K. V. Arachchi and Y. Jeon .1999. Food applications of chitin and chitinsans. Trends in Food and Tech. 10: 37-51.
25. Sharon, N. 2007. Lectins: Carbohydrate - specific reagent and biological recognition molecules. J. Biol. Chem. 282(5): 2753-2764.
26. Sharon, N. and H. Lis. 2004 . History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiol. 14(11): 53-62.
27. Tateno, H.; H. C. Winter; J. Petryniak and I. J. Goldstein. 2003. Purification, characterization, molecular cloning and expepression of novel members of jacalin-related lectin from risomes of the true fern